

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-143879

(43)Date of publication of application : 06.06.1995

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

G01N 33/50

(21)Application number : 05-317411 (71)Applicant : TOAGOSEI CO LTD

(22)Date of filing : 24.11.1993 (72)Inventor : EZAKI TAKAYUKI
SHIMIZU KAZUO

(54) SEPARATION AND PURIFICATION OF DNA

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a process for easily separate and purify DNA from a cell in high purity.

CONSTITUTION: DNA is released from a cell by the treatment with a surfactant, a cell wall digesting enzyme and a proteinase. An aqueous solution containing urea and sodium phosphate is prepared from the treated cell and contacted with hydroxyapatite to effect the adsorption of the DNA. The hydroxyapatite is washed with a mixed aqueous solution of urea and sodium phosphate and then with water and contacted with an aqueous solution of ammonium phosphate, ammonium carbonate or ammonium bicarbonate to obtain an eluate containing the DNA. DNA is precipitated from the eluate by an alcohol precipitation process after diluting the eluate with water.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision
of rejection]

[Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of
rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-143879

(43) 公開日 平成7年(1995)6月6日

(51) IntCl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09				
G 0 1 N 33/50	P	9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平5-317411

(22) 出願日 平成5年(1993)11月24日

(71) 出願人 000003034

東亜合成株式会社

東京都港区西新橋1丁目14番1号

(72) 発明者 江崎 孝行

岐阜県岐阜市加納鉄砲町一丁目13-1

(72) 発明者 清水 和郎

愛知県名古屋市南区烏栖二丁目12-20

(54) 【発明の名称】 DNAの分離精製方法

(57) 【要約】

【目的】細胞からDNAを高純度で且つ簡便に分離精製する方法を提供する。

【構成】界面活性剤、細胞壁溶解酵素及び蛋白分解酵素との処理によりDNAを遊離させた細胞を、尿素及びリン酸ナトリウムを含有する水溶液とし、該水溶液をヒドロキシアパタイトに接触せしめてDNAを吸着させた後、該ヒドロキシアパタイトを、尿素及びリン酸ナトリウムの混合水溶液で洗浄し、更に水洗してから、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム又は炭酸水素アンモニウムの水溶液と接触せしめてDNAを含有する溶出液を収得し、水で希釈した上でアルコール沈澱法によりDNAを析出させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】細胞を、界面活性剤及び蛋白分解酵素との処理に附してDNAを遊離させ、尿素及びリン酸ナトリウムを含有する水溶液とし、該水溶液をヒドロキシアパタイトに接触せしめてDNAを吸着させた後、該ヒドロキシアパタイトを、尿素及びリン酸ナトリウムの混合水溶液で洗浄し、更に水洗してから、溶離液である1.8～2.0モル濃度のリン酸アンモニウム水溶液と接触せしめてDNAを含有する溶出液を収得し、該溶出液に水を加え10倍（容積）に希釈した後、アルコールを添加混合して、DNAを析出させることを特徴とするDNAの分離精製方法。

【請求項2】請求項1において、溶離液が、炭酸アンモニウム又は炭酸水素アンモニウムを1.8～2.0モル濃度含有する水溶液であり、溶出液の希釈に用いる水の量が2倍（容積）であることを特徴とするDNAの分離精製方法。

【請求項3】ヒドロキシアパタイトとして、六角柱状又は針状のヒドロキシアパタイトからなり、細孔容積が1～5ml/gであるヒドロキシアパタイト凝集体を用いることを特徴とする請求項1又は請求項2記載のDNAの分離精製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、細胞からDNAを高純度で且つ簡便に分離精製する方法に関する。本発明の方法は、原核生物並びに真核生物の遺伝子解析や所謂DNA診断又は遺伝子操作等において必要とされている生物細胞のDNAの分離精製法として有用である。

【0002】

【従来の技術】細胞からDNAを抽出調製することに関しては種々の方法が提案されており、広く採用されている基本的なDNA抽出調製法として、以下の①から⑦の工程からなる方法がある。

①細胞を界面活性剤及び必要に応じて細胞壁分解酵素で処理して溶解すると共に蛋白分解酵素で蛋白質を分解させる。

②必要に応じて、セチルトリメチルアンモニウムブロミド処理により多糖類を除去する。

③フェノール・クロロホルム処理により蛋白質を除去する。

④アルコール添加によってDNA（RNAが混在する）を沈澱収得する。

⑤リボヌクレアーゼA処理によりRNAを分解する。

⑥フェノール・クロロホルム処理によりリボヌクレアーゼAを除去する。

⑦アルコール添加によってDNAを沈澱収得する。

上記の方法は、高価な機器を必要とせず、又DNAの収量がμgからmgのオーダーにわたり巾広く適用できる便利さがあるが、他方多糖類、蛋白質及びRNAの除去に

それぞれの操作が必要で、多段階の工程を要すること、中でもフェノール・クロロホルム処理工程において発生する廃液は煩瑣な廃棄処理が必要であり、難点を少なしとしない。

【0003】さて、ヒドロキシアパタイトがDNA吸着能を有することは既に知られており、この性質を利用して上記方法を改善する試みがある。即ち、ブリテン等は、上記工程①で得られる細胞崩壊液をヒドロキシアパタイトと接触させるに際して、細胞崩壊液を約8モル濃度の尿素と約0.24モル濃度のリン酸ナトリウムを含有する水溶液としたとき、ヒドロキシアパタイトにDNAは吸着するが、多糖類、蛋白質及びRNAは吸着しないことを見出し、これを利用したDNAの分離精製方法を提示している（R.J.Britten et al. Carnegie Inst. Wash. Yearbook 68, 400, 1970年及びW.Meinke et al. Anal. Biochem., 58, 82, 1974年）。しかしながら、この方法は実際にはあまり利用されていない。それは、DNAを溶離させるのに、0.48モル濃度という高濃度のリン酸ナトリウム溶離液を使用するため、例えば制限酵素処理等の諸酵素反応が阻害され、折角収得したDNAに対する以降の諸操作を実施できない状況となるからである。

【0004】このような状況を避けるため、溶出液中においてDNAと混在するリン酸ナトリウムを除去する方法として、溶出液の透析又はゲル濾過が考えられるが、いずれもDNAの付着損失を招き、殊に高分子DNA鎖では切断も起こり易く、DNAを損なうことなく収得することが困難となる。又、アルコール添加によりDNAを析出させる所謂アルコール沈澱法でも、DNAとリン酸ナトリウムが同時に沈澱してしまい、これを回避するには溶出液を水で約500倍に希釈する必要があるが、このように溶出液中のDNA濃度を小さくするとDNAも沈澱として得られない。

【0005】所で、ブリテン等の方法が実用化されていないのには更に原因がある。即ち、従来吸着剤として調製され又は提供されてきたヒドロキシアパタイトは、例えばチゼリウス（A.Tiselius）の提示になるものは板状又は鱗片状微小粒子で圧密されて、通液性が低く、分析に用いる程度の流速を得るにも加圧が必要な程で、特に本発明における分離対象のDNAは高分子である上に、多数の電離基をもって大きく広がっており、そのうち分子量の大きなものは、圧密されたヒドロキシアパタイト間の細隙に捕らえられて回収することができない。又、ヒドロキシアパタイトの微小粒子を団塊に固結したのももあり、あたかも液の流れは遅滞なきに見受けられるが、大きなDNA分子は固結粒子間の行き止まりに捕捉され、回収されないことは同然である。事実、板状又は鱗片状のヒドロキシアパタイトを試用する実験者のいずれもが努力を放棄する結果となっている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、従来より広く実施されている基本的なDNA抽出調製法をヒドロキシアパタイトを用いて実施する場合の問題点を解決し、細胞からDNAを高純度で且つ簡便に分離精製する方法を提供するものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題点を解決するため鋭意検討した結果、特定の濃度を有するリン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム又は炭酸水素アンモニウムの水溶液を溶離液として試みた所、溶出液を水で特定の倍率で希釈すると、意外にも、アルコール沈殿法により、溶出液からリン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム又は炭酸水素アンモニウムを析出させずにDNAのみを析出させることができることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、第一の本発明は、界面活性剤及び蛋白分解酵素との処理に附してDNAを遊離させ、尿素及びリン酸ナトリウムを含有する水溶液とし、該水溶液をヒドロキシアパタイトに接触せしめてDNAを吸着させた後、該ヒドロキシアパタイトを、尿素及びリン酸ナトリウムの混合水溶液で洗浄し、更に水洗してから、溶離液である1.8～2.0モル濃度のリン酸アンモニウム水溶液と接触せしめてDNAを含有する溶出液を収得し、該溶出液を水で10倍に希釈した後、アルコールを添加混合して、DNAを析出させることを特徴とするDNAの分離精製方法であり、第二の本発明は、上記の溶離液が、炭酸アンモニウム又は炭酸水素アンモニウムを1.8～2.0モル濃度含有する水溶液であり、溶出液の希釈に用いる水の量が2倍（容積）であることを特徴とするDNAの分離精製方法であり、第三の本発明は、上記のヒドロキシアパタイトとして、六角柱状又は針状のヒドロキシアパタイトからなり、細孔容積が1～5ml/gであるヒドロキシアパタイト凝集体を用いることを特徴とする請求項1又は請求項2記載のDNAの分離精製方法である。

【0008】以下、本発明を詳述する。

（細胞崩壊）本発明の方法は、細胞からその遺伝子の成分であるDNAを分離精製することに係わり、本発明において、細胞の種類は制限はなく、原核細胞及び真核細胞のいずれであっても良い。本発明の方法は、先ず細胞を崩壊してDNAを遊離せしめることから出発する。細胞崩壊を行うには、細胞を界面活性剤で処理すれば良い。界面活性剤の好ましい具体例として、例えばドデシル硫酸ナトリウムやN-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム等がある。なお、原核細胞においては、細胞壁のあるものが多いので、細胞崩壊を行うためには、リゾチーム或いはクロモベプチターゼ等の細胞壁多糖類分解酵素を併用することが望ましい。

【0009】次に、細胞内において蛋白質と結合しているDNAを遊離させるために、蛋白分解酵素処理をする。蛋白分解酵素の好ましい具体例として、例えばプロ

ナーゼや殊に最近プロティナーゼK（和光薬品株式会社製）がある。

【0010】界面活性剤、細胞壁溶解酵素又は蛋白分解酵素で細胞を処理する工程は、同時に行っても、別々に行っても良く、好ましい処理条件は、室温から60℃、より好ましくは37℃から60℃に至る間の温度で、数分から数時間にわたる。そして、充分DNAを遊離せしめることが望ましい。なお、フレンチプレス等の機械的崩壊作用を利用することも可能であるが、DNAの解裂を避けるため、できれば穏和な作用条件が望ましい。

【0011】上記のようにして細胞崩壊を行った後、DNAを遊離させた細胞を尿素及びリン酸ナトリウムを含有する水溶液とする必要がある。この水溶液をヒドロキシアパタイトと接触させることにより、ヒドロキシアパタイトに蛋白質、RNA及び多糖類等の不純物を吸着させず、DNAのみを吸着させることができる。上記水溶液における好ましい尿素の濃度は6～8モル濃度であり、好ましいリン酸ナトリウムの濃度は0.20～0.24モル濃度である。このように各成分の濃度を調整すると、蛋白質等のDNA以外の不純物がヒドロキシアパタイトに吸着するのを抑制することができる。

【0012】（吸着）上記のようにして得た溶液をヒドロキシアパタイトに接触せしめて、DNAをそれに吸着せしめる。

【0013】従来、ヒドロキシアパタイトにDNAを吸着させる方法に特に制限はなく、例えば上記のようにして得たDNAを含有する溶液（以下、単にDNA含有液という）とヒドロキシアパタイトとを、容器中で攪拌しながら接触させる方法、或いはカラムに充填したヒドロキシアパタイトにDNA含有液を通過する方法等がある。操作を連続的に行うには、通常カラムに通過する方法が好ましい。しかし、一般のヒドロキシアパタイトにおいてはカラムに充填した場合、DNA含有液は通常高粘性であるため、カラムを円滑に通過させることは容易ではないので、カラム通過を行う場合には、円滑にカラムを通過せしめることができ、負荷、洗浄を極めて円滑且つ効果的に遂行できることから、ヒドロキシアパタイトとして、ヒドロキシアパタイト凝集体を用いることが好ましい。

【0014】上記のヒドロキシアパタイト凝集体は、特開昭62-17690号公報又は米国特許第5,073,357号に記載されたものと同じであって、六角柱状又は針状のヒドロキシアパタイト単結晶が凝集した、平均粒径60～100μmの凝集体であり、細孔容積が1～5ml/gなるもの（以下、単にヒドロキシアパタイト凝集体と略記する）であり、市販品としてギガバイト（東亜合成化学工業株式会社製商品名）がある。

【0015】この材料は、極めて高い通液性を有し、高分子電解質水溶液に特有の高粘性を呈するDNA含有溶液も円滑に通過し、その間効果的な吸脱着による分離精

製が遂行される。殊に、従前のヒドロキシアパタイト材料に見られる大きなDNA断片の贅留損失の回避が期せられる。

【0016】(洗浄) 上記のようにして、ヒドロキシアパタイトにDNAを吸着させた後、尿素及びリン酸ナトリウムの混合水溶液を暫く流して、蛋白質、RNA、多糖類等を流去し、次いで水を通して、尿素、リン酸ナトリウムを洗去する。尿素及びリン酸ナトリウムの好ましい混合水溶液として、6~8モル濃度の尿素、0.20~0.24モル濃度のリン酸ナトリウムを含有する緩衝液(PH値6.8、以下PU液と略記する)がある。この水溶液を用いることにより、効率的に蛋白質、RNA、多糖類等の不純物を流去することができる。

【0017】(溶離) 上記のようにして、洗浄した後、従来の方法では、0.48M-リン酸ナトリウム水溶液でDNAを溶離させるのであるが、本発明では溶離液として、1.8~2.0モル濃度のリン酸アンモニウム水溶液、同濃度の炭酸アンモニウム又は、同濃度の炭酸水素アンモニウムの各水溶液を使用する。溶離液の濃度が1.8モル濃度未満では、DNA以外の不純物が混在してしまい、高純度のDNAを得ることができないという問題があり、一方溶離液の濃度が2.0モル濃度を越えるとヒドロキシアパタイトに対するDNAの吸着効率が低下するため、収率良くDNAを得ることが困難となる。

【0018】(アルコール沈殿) 上記のようにして溶離して得た溶出液を、水で希釈した後、アルコールを添加混合して、DNAを析出させる。溶離液として、リン酸アンモニウム水溶液を用いた場合には、水による溶出液の希釈倍率は10倍であり、炭酸アンモニウム又は炭酸水素アンモニウムを用いた場合には、水による溶出液の希釈倍率は2倍である。もしも、溶離液として、0.48Mリン酸ナトリウム水溶液を使用した場合には、アルコールの添加により溶出液からDNAを沈殿させるためにも、その他の後工程のためにも、リン酸ナトリウムを除去するために、透析乃至ゲル濾過が必要であるが、これには時間と手間を要し、且つDNAの劣化、損失が招来されるという問題がある。

【0019】上記の好ましいアルコールとして、エチルアルコール及びイソプロピルアルコール等があり、その好ましいアルコールの添加条件として、水で希釈した後、その希釈した溶出液の2倍量(容積)のエチルアルコール又は等倍量(容積)のイソプロピルアルコールを添加する。このような条件でアルコール沈殿を行うことによって、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム又は炭酸水素アンモニウムを沈殿させずに、DNAのみを沈殿させることができる。

【0020】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるもので

はない。

【0021】実施例1(グラム陰性細菌フラボバクテリアからのDNAの分離精製)

フラボバクテリア(Flavobacteria)の普通寒天平板1夜培養を集菌し、その100mqを10mM EDTA加生理食塩水1mlに懸濁し10mq/ml リゾチーム液100μlを混合し、37℃に1時間保持した。次いで、20% SDS液50μlと10mq/ml プロティナーゼK(和光薬品株式会社製)を50μl添加して、60℃に1時間保持する。

【0022】これに8M-尿素、0.24M-リン酸ナトリウム緩衝液pH値6.8(以下、PU液と略記する)9mlを混合し、予めPU液で平衡化したヒドロキシアパタイト凝集体1ml(0.8φ×2.0cm)を充填したカラムに負荷する(流速:約0.5ml/分)。更に、PU液5mlを通し、次いで水10mlで洗浄した後、2M-リン酸アンモニウム水溶液(pH値6.8)2mlを通してDNAを溶出する。溶出液に水を加えて20mlとした上で、冷イソプロピルアルコール20mlを重層して放置5分後、遠心して析出するDNAを沈殿として上澄みと分離し、沈殿には70%エチルアルコールを加えて再度遠心し、沈殿を収得し、乾燥する。

【0023】乾燥DNAを1mM-EDTA、10mM-トリス塩酸緩衝液(pH値8.0)10mlに溶解し、波長260nm及び280nmの紫外線吸光度を測定し、下記の値を得た。

$OD_{260} = 0.372$, $OD_{280} = 0.210$

これより、DNA収量は0.19mqであり、又 $OD_{260} / OD_{280} = 1.77$ と算出される。

【0024】実施例2(グラム陽性細菌ストレプトコッカス・ミティスからのDNAの分離精製)

ストレプトコッカス・ミティス(*Streptococcus mitis*)をトッド・ヘイウッド(Todd-Heywood)液体培地に1夜培養し、6000rpmで遠心集菌し、その0.5gを5mM-EDTA(pH8.0)5mlに懸濁し、これに細胞壁溶解酵素アクロモベプチダーゼ(和光薬品株式会社製)10mq/ml液を250μl添加して、37℃2時間保持し、次いで20%SDS・アルカリ液250μlを加えて55℃で1時間処理し、更に10mq/ml プロティナーゼKを250μl加えて、引き続き55℃で1時間処理する。

【0025】これにPU液45mlを混合し、予めPU液で平衡化したヒドロキシアパタイト凝集体5ml(1.0φ×6.5cm)を充填したカラムに負荷する(流速:約1ml/min)。更にPU液25mlを通し、次いで水50mlで洗浄した後、2M-炭酸水素アンモニウム水溶液(pH8.2)10mlを通してDNAを溶出する。溶出液に水を加えて20mlとした上で、冷エチルアルコール40mlを重層して放置5分後、遠心して白色沈殿を上澄みと分離し、沈殿を70%エチルアルコールに懸濁し、再度遠

心し、沈澱を分離し、乾燥する。

【0026】乾燥DNAを1mM-EDTA、10mM-トリス塩酸緩衝液(pH値8.0)25mlに溶解し、実施例1に倣って紫外線吸光度を測定し、下記の値を得た。

$OD_{260} = 0.757$, $OD_{280} = 0.421$

これより、DNA収量は0.95mgであり、又 $OD_{260} / OD_{280} = 1.80$ と算出される。

【0027】実施例3(牛型結核菌マイコバクテリウム・ボビスからのDNAの分離精製)

マイコバクテリウム・ボビス(*Mycobacterium bovis*) 10
を小川培地に約1ヵ月培養し、集菌した。その100mgを1mM-EDTA、10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)1mlに懸濁し、10mg/ml リゾチーム液100 μ lを添加し、37℃で18時間保持した。次いで、20%SDS液50 μ lと10mg/ml プロティナーゼK液を50 μ l添加して、60℃に1時間保持する。

【0028】これにPU液9mlを混合し、予めPU液で平衡化したヒドロキシアパタイト凝集体2ml(0.8 ϕ ×3.5cm)を充填したカラムに負荷する(流速:約0.5ml/分)。更に、PU液10mlを通し、次いで水20mlで洗20
浄した後、2M-炭酸アンモニウム水溶液(pH値9.2)5mlを通してDNAを溶出する。溶出液に水を加えて10mlとした上で、冷エチルアルコール20mlを重ねて放置5分後、遠心して白色沈澱を上澄みと分離し、沈澱に70%エチルアルコールを加えて懸濁し再度遠心し、沈澱を収得し、乾燥する。

【0029】乾燥DNAを1mM-EDTA、10mM-トリス塩酸緩衝液(pH値8.0)10mlに溶解し、実施例1に倣って紫外線吸光度を測定し、下記の値を得た。

$OD_{260} = 0.452$, $OD_{280} = 0.254$

これより、DNA収量は0.23mgであり、又 $OD_{260} / OD_{280} = 1.78$ と算出される。

【0030】実施例4(酵母染色体DNAの分離精製)
サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)を5mlのYPD培養液(酵母エキス1%、ポリペプトン1%、グルコース2%)で1昼夜培養し遠心集菌する。その100mgを0.1M-EDTA(pH値7.5)1mlに懸濁し10mg/mlのZymolyase(キリンビール)を10 μ l添加し、37℃に1時間保持した後、10%N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム液100 μ lと10mg/ml プロティナーゼKを50 μ l添加して、60℃に1時間保持する。 40

【0031】これにPU液9mlを混合し、予めPU液で平衡化したヒドロキシアパタイト凝集体2ml(0.8 ϕ ×3.5cm)を充填したカラムに負荷する(流速:約0.5ml/分)。更に、PU液5mlを通し、次いで水10mlで洗浄した後、2M-炭酸アンモニウム水溶液(pH値9.2)5mlを通してDNAを溶出する。溶出液に水を加えて10mlとした上で、冷エチルアルコール20mlを重ねて放置5分後、遠心して白色沈澱を上澄みと分離し、沈澱に70%エチルアルコールを加えて懸濁し再度遠心し、沈澱を分離し、乾燥する。

【0032】乾燥DNAを1mM-EDTA、10mM-トリス塩酸緩衝液(pH値8.0)10mlに溶解し、実施例1に倣って紫外線吸光度を測定し、下記の値を得た。

$OD_{260} = 0.416$, $OD_{280} = 0.233$

これより、DNA収量は0.21mgであり、又 $OD_{260} / OD_{280} = 1.79$ と算出される。

【0033】

【発明の効果】本発明は、高価な機器を必要とせず、又DNAの収量が μ gからmgのオーダーにわたり巾広く適用できるという簡便さを有している。即ち、細胞崩壊液から一段の操作で混在する蛋白質、RNA及び多糖類等を除去することができ、従来より用いられている所謂フェノール・クロロホルム水混合廃液を生ずることから免れる。又、DNAを含有する溶出液を水で希釈するのみでアルコール沈澱法が可能となり、透析或いはゲル濾過等の、DNA分子の損失をもたらす工程を不要とし、高分子のDNAを収率良く得ることができる。本発明は、上記のように簡便さを有すると共に、細胞からDNAを高純度で分離精製することができ、原核生物並びに真核生物の遺伝子解析や所謂DNA診断又は遺伝子操作等において必要とされる、生物細胞からのDNAの分離精製法として有用である。溶離液として、リン酸アンモニウム水溶液を用いる場合は、溶出液を水で約10倍に希釈するのみで、アルコール添加によってDNAを純度良く沈澱せしめることができ、炭酸アンモニウム又は炭酸水素アンモニウムの水溶液を用いる場合は、溶出液を僅かに水で2倍に希釈するのみでDNAのアルコール沈澱分離を遂行することができる。ヒドロキシアパタイトとして、ヒドロキシアパタイト凝集体を用いる場合には、カラム通液方式で、短時間にDNAを分離精製することができる。